

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Zuzana Kalaninová

PŘÍPRAVA AFINITNÍCH NOSIČŮ PRO KLINICKOU DIAGNOSTIKU

Preparation of affinity surfaces for clinical diagnostics

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Pompach, Ph.D.

Školitel-konzultant: Mgr. Petra Darebná

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Podpis.....

Abstrakt

Botulotoxiny jsou skupinou proteinových jedů produkovaných bakteriemi rodu *Clostridium*. Tyto toxiny patří mezi vysoce toxické látky způsobující paralytické onemocnění známé jako botulismus. Na základě své endopeptidasové aktivity toxiny blokuji uvolnění neurotransmiteru v spojích nervových buněk. Jelikož se účinky intoxikace dostaví již do 48 hodin a toxin je schopen ve své aktivní formě setrvat až po dobu několika měsíců, byly kategorizovány jako potenciální zbraň bio-terorismu. Z hlediska účinné léčby je tedy důležité nalézt rychlou metodu, která bude schopna nejenom stanovit přítomnost botulotoxinu, ale i jeho konkrétní typ.

Tato práce je dokumentací nové metody potenciálně využitelné ke stanovení přítomnosti botulotoxinů v různých maticích. Metoda je založena na detekci produktů proteasové aktivity botulotoxinu A (BoNT/A) pomocí afinitních nosičů a MALDI hmotnostní spektrometrie. V rámci této práce byly k detekci a stanovení limitu detekce produktů aktivity BoNT/A využity afinitní nosiče připravené metodou měkkého přistávání iontů. Pro imobilizaci byly zvoleny proteiny s vysokou afinitou k biotinu – avidin, neutravidin a streptavidin – pro účely nabohacení biotinylovaných peptidových produktů BoNT/A reakce. Metoda využívající kombinaci afinitních nosičů a MALDI hmotnostní spektrometrie se jeví jako velice výhodná pro detekci BoNT/A z důvodu její citlivosti, robustnosti a časové nenáročnosti.

Klíčová slova: metoda měkkého přistávání iontů, neutravidin, botulotoxin A, BoNT/A, MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie

Abstract

Botulinum toxins are group of protein venoms produced by *Clostridium* bacteria. These toxins belong to the most toxic substances causing paralytic disease called botulism. The endopeptidase activity of the toxins leads to the blockage of neurotransmitters release to neural junctions. Since the first symptoms of botulism are observed within 48 hours and toxin remains active for months, botulinum toxins are considered as potential bio-terrorism agents. For successful treatment, fast assays for detection of the toxin presence and type are highly required.

This work presents a new method that could be potentially used for determination of botulotoxin in various matrices. The method is based on the detection of products of botulinum toxin A (BoNT/A) endopeptidase activity by affinity surfaces prepared by ambient ion soft landing and MALDI mass spectrometry. For immobilization and subsequent enrichment of biotinylated products of BoNT/A activity, proteins with high affinity to biotin – avidin, neutravidin and streptavidin – were used. The presented method, which combines affinity surfaces with MALDI mass spectrometry is sensitive, robust and fast and might be potentially used for detection of BoNT/A activity.

Key words: ambient ion soft landing, neutravidin, botulinum toxin A, BoNT/A, MALDI/TOF mass spectrometry

(In Czech)

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli, RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D., a konzultantce, Mgr. Petře Darebné, za veškerou pomoc, trpělivost a vedení při vzniku této práce. Zároveň chci poděkovat celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji i mé rodině a příteli za neustálou podporu nejenom v tomto posledním semestru, ale po celou dobu mého studia.

Obsah

1. Úvod	8
1.1. Afinitní nosiče	8
1.1.1. Metoda měkkého přistávání iontů	8
1.1.2. Významné mezníky ve vývoji modifikace povrchů metodou ISL	10
1.1.3. Proteinové povrchy	12
1.1.3.1. MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie	12
1.2. Botulotoxiny	13
1.2.1. Endopeptidasová aktivita botulotoxinů	14
1.2.2. Detekce botulotoxinů	15
1.2.2.1. Testy na myších	15
1.2.2.2. ELISA	16
1.2.2.3. Fluorogenní peptidy	16
1.2.2.4. Endopep-MS	17
2. Cíl práce	18
3. Experimentální část	19
3.1. Seznam použitého materiálu a přístroje	19
3.1.1. Přístroje a pomůcky	19
3.1.2. Chemikálie	19
3.1.3. Peptidový standard pro BoNT/A	20
3.1.4. Pufry	20
3.2. Experimentální metody	21
3.2.1. Příprava afinitních nosičů	21
3.2.2. Reakce na afinitních nosičích	22
3.2.2.1. Práce s peptidovým standardem pro BoNT/A	22
3.2.2.2. MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie	23
3.2.2.3. Práce s toxinem BoNT/A	23
4. Výsledky	25
5. Diskuze	32
6. Závěr	35
Použitá literatura	36

Seznam zkratek

AISL	metoda měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku (z angl. <i>Ambient Ion Soft Landing</i>)
BoNT/A (B)	botulotoxin typu A (B)
BoNTs	botulotoxiny
CCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
(k)Da	jednotka molekulové hmotnosti (kilo)Dalton
ELISA	analytická imunometoda (z angl. <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FA	kyselina ferulová
g	gravitační zrychlení
ISL	metoda měkkého přistávání iontů (z angl. <i>Ion Soft Landing</i>)
keV	jednotka energie kiloelektronvolt
kV	jednotka elektrického napětí kilovolt
LC-ESI-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem ve spojení s kapalinovou chromatografií
(M)LD ₅₀	(myši) letální dávka pro 50 % sledované populace
m/z	poměr hmoty k náboji
MALDI	metoda ionizace laserem za pomoci matrice (z angl. <i>Matrix Assisted Laser Ionization/Desorption</i>)
MBT	2-merkaptobenzothiazol
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>Mass Spectrometry</i>)
RPM	počet otáček za minutu (z angl. <i>rotates per minute</i>)
S/N	poměr signálu k šumu (z angl. <i>Signal-to-Noise</i>)
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	analyzátor doby letu (z angl. <i>Time Of Flight</i>)

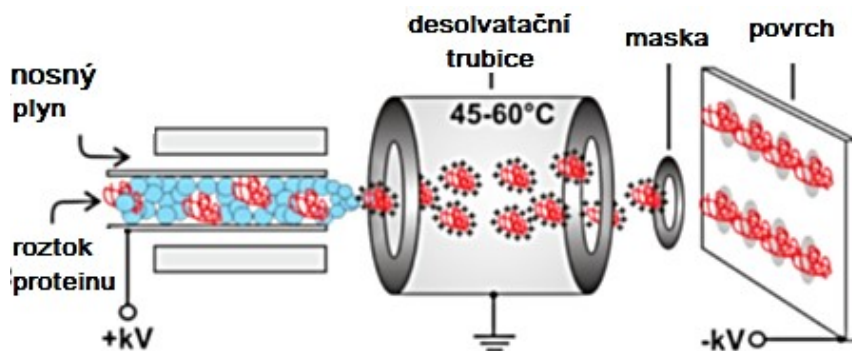
1.Úvod

1.1. Afinitní nosiče

1.1.1. Metoda měkkého přistávání iontů

Metoda měkkého přistávání iontů je jedním ze způsobů modifikace povrchů. Její název je odvozen z anglického výrazu *Ion Soft Landing* (ISL) a princip spočívá ve vystavení upravovaného povrchu proudu hypertermálních iontů, což je možné provádět jak ve vakuu, tak za atmosférického tlaku. Možnost výběru deponovaných iontů na základě jejich poměru hmoty k náboji (m/z), společně s vlivem na tvar, velikost a polohu tohoto proudu iontů na cílovém povrchu jsou důvody, proč je tato metoda úpravy povrchů jedinečná¹.

Při instrumentalizaci ve vakuu jsou hlavními částmi přístroje pro modifikaci zdroj iontů vzorku, iontová optika, která slouží na uvedení iontů do vakua a k jejich přenosu v něm, hmotnostní filtr pro výběr požadovaných iontů a detektor¹. Oproti tomu je přístroj pro deponování za atmosférického tlaku (z angl. *Ambient Ion Soft Landing*; AISL) svým složením značně jednodušší. Jak je vidět z Obr. 1 (str. 8), vzorek (v tomto případě protein) je ionizován pomocí elektrospreje, na kterém bylo vloženo napětí v řádech kilovoltů (kV), za vzniku kladně nabitých iontů. Ty následně ohřátý nosný plyn (inertní plyn, obvykle dusík) vnáší do desolvatační trubice, kde jsou zbaveny svého solvatačního obalu a následně jsou deponovány na záporně nabitý povrch (opět v řádech kV)². Bylo dokázáno, že za těchto podmínek zůstávají ionty v neporušeném stavu, což má velký význam především při práci s proteiny, které si zachovávají nativní strukturu a biologickou aktivitu³.

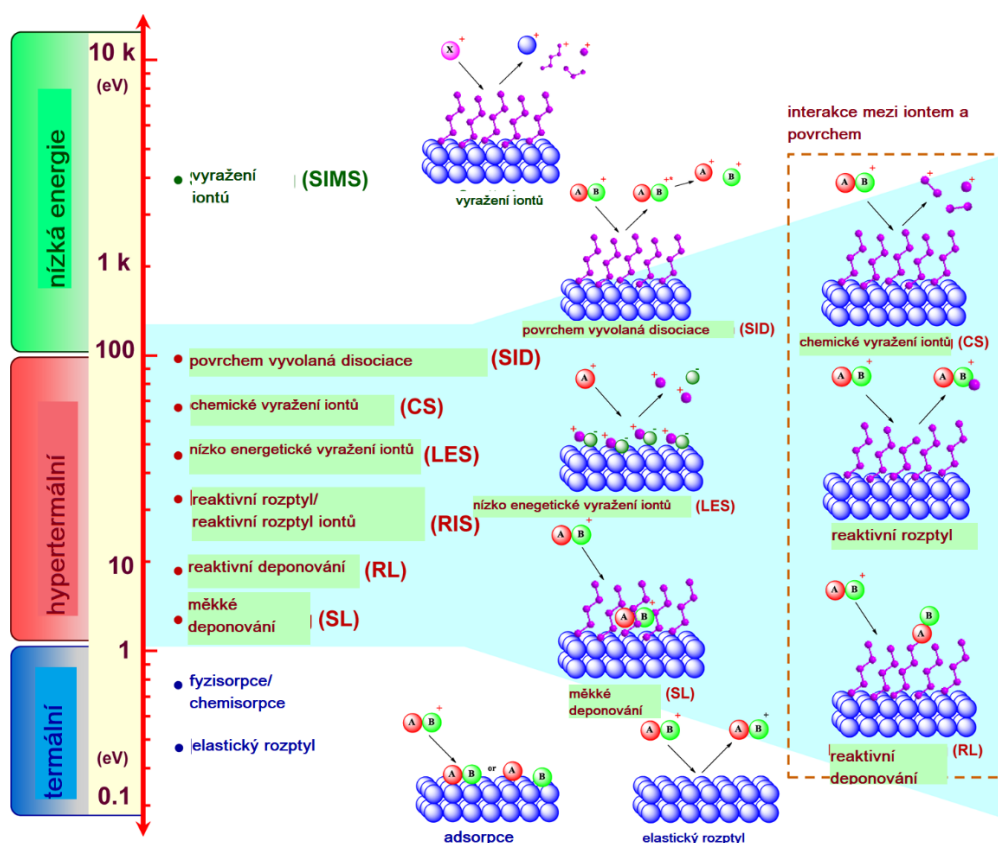


Obr. 1: Schéma pro přípravu afinitních nosičů metodou měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku. Převzato a upraveno².

Při srážce deponovaných iontů s povrchem bylo pozorováno několik konkurenčních procesů, které závisí na energii a úhlu této srážky a na samotné povaze iontů a povrchu. Přehled těchto procesů a příslušné energie jsou znázorněny na Obr. 2 (str. 9). Patří sem například vyražení iontů, jejich rozptyl a povrchem vyvolaná disociace či přenos náboje na povrch^{1,4}. Jev, kdy působením proudu primárních iontů o kinetické energii v kiloelektronvoltech (keV) na povrch dochází k vyražení určitých sekundárních částic z tohoto povrchu se nazývá vyražení iontů (z angl. *sputtering*) a zabývá se jím hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (z angl. *Secondary Ion Mass Spectrometry*; SIMS), která vzniklé ionty analyzuje⁴.

Jsou-li energie srážek nízké, nedochází k fragmentaci iontů a jedná se o měkké deponování, které je nedestruktivní. Při srážkách o vyšší energii může docházet k reaktivnímu deponování, při kterém vzniká kovalentní vazba mezi iontem a příslušným povrchem. Reaktivní deponování se proto využívá pro stabilní imobilizaci^{1,4}.

Abychom zabránili nabíjení povrchů a následné blokaci přichozího proudu iontů, využívají se k modifikaci metodou měkkého přistávání vodivé nebo polovodivé materiály, mezi které patří například tzv. samo-skládající se monovrstvy organických molekul (SAMs; z angl. *Self-assembled monolayers*)⁵, kovové povrchy (zlato, nerezová ocel) i povrchy s vrstvou oxidu kovu⁶.



Obr. 2: Přehled procesů, které lze pozorovat při srážce proudu iontů s povrchem při dané kinetické energii iontů. Převzato a upraveno⁴.

1.1.2. Významné mezníky ve vývoji modifikace povrchů metodou ISL

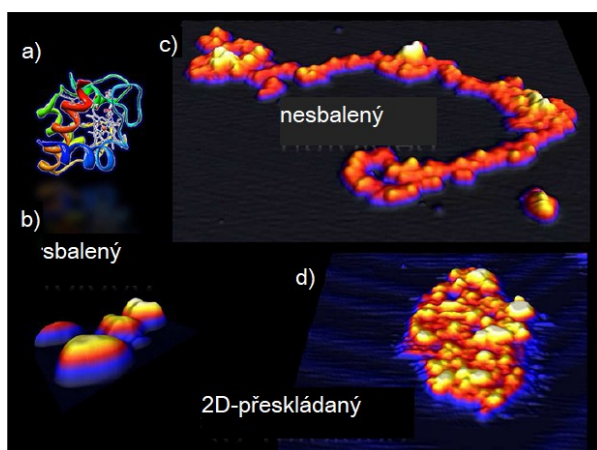
První zmínka⁷ o modifikaci povrchů metodou měkkého přistávání iontů pochází z roku 1977 z laboratoře Roberta Grahama Cookse ve Spojených státech, který představil možnost kontrolované úpravy povrchů pomocí proudu iontů o nízké energii (10 eV) vybraných na základě hodnoty jejich poměru hmoty k náboji (m/z). Pro tyto účely použil mono-, di- a triatomické ionty obsahující síru a olovnatý povrch, který po modifikaci následně zkoumal pomocí elektronové spektroskopie pro chemickou analýzu (ESCA), dnes známou také jako rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS).

Cooks a jeho spolupracovníci také jako první v roce 2004 dokázali, že proteiny po depozici na povrch neztrácí svou biologickou aktivitu⁸. Ionty proteinů po separaci hmotnostním spektrem byly deponovány na kapalně povrchy tvořené glycerolem. Na těchto površích byly zároveň schopny proteiny identifikovat pomocí hmotnostní

spektrometrie s ionizací laserem za pomoci matrice (MALDI MS) na základě detekce peptidů vzniklých štěpením trypsinem.

Alternativou výše uvedené metody je její aplikace za atmosférického tlaku. Publikace skupiny prof. Cookse z roku 2011 popisuje tento proces deponování molekul generovaných elektrosprejem a posléze oddělených od neutrálních molekul pomocí deflektorových elektrod. Pro odstranění solvatačního obalu iontů byly využity dva typy desolvatačních trubic – přímá pro depozici mikrokapiček a stočená (jednou nebo vícekrát) pro dosažení vyššího stupně desolvatace³.

Mezi výhody tohoto způsobu modifikace patří možnost přímého sledování struktur a aktivit velkých, obtížně izolovatelných biomolekul na povrchu pomocí vhodně volených experimentálních podmínek. V roce 2012 Deng a spolupracovníci představili experimenty⁹, při kterých na příslušné kovové povrchy deponovali pomocí elektrospreje sbalené a nesbalené molekuly cytochromu c a ty následně studovali pomocí skenovací tunelové mikroskopie. Zjistili, že zatímco sbalené molekuly si ponechaly svou terciární strukturu, nesbalené pozorovali jako prodloužené polymerní řetězce. Navíc na slabě interagujících površích došlo k přeskládání nesbaleného proteinu do plochých a nepravidelných dvoudimensionálních (2D) útvarů (viz Obr. 3).



Obr. 3: Povrchy s deponovanými molekulami cytochromu c zkoumané skenovací tunelovou mikroskopií – a) „ribbon“ zobrazení struktury proteinu, b) sbalená, c) nesbalená, d) 2D přeskládána struktura. Převzato a upraveno⁹.

1.1.3. Proteinové povrchy

Depoziční zařízení (Obr. 1, str. 8) umožňuje za atmosférického tlaku připravit povrchy o různé geometrii, počtu a velikosti jednotlivých modifikovaných bodů. Nejčastěji jsou modifikované povrchy kompatibilní s příslušnými držáky MALDI destiček a umožňují tak jejich vložení do hmotnostního spektrometru. Mezi takové povrchy patří například ITO sklo (z angl. *Indium Tin Oxide*), které je pokryto tenkou vrstvou vodivé směsi oxidu cínu a india nebo terčik známý pod komerčním názvem Biotarget od společnosti Bruker Daltonics používaný pro identifikaci bakterií. Výhodou povrchů připravených metodou měkkého přistávání je jejich vysoká specifita, z důvodu absence mezivrstev, které bývají často používané při přípravě ostatních povrchů².

Modifikované povrchy připravené metodou měkkého přistávání iontů mohou sloužit k nejrozličnějším bioanalytickým účelům, při kterých dochází k interakci analytu s deponovanou molekulou (proteinem) přímo na povrchu. Různé biologické vlastnosti deponovaných proteinů ovlivňují uplatnění příslušných povrchů. Například povrchy modifikované proteolytickými enzymy umožňují štěpení proteinů přímo na povrchu a následnou detekci peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie². Naopak povrchy upravené lektiny nebo protilátkami tvoří afinitní nosiče umožňující nabohacení analytu přímo na povrchu opět s možností detekce MALDI hmotnostní spektrometrií nebo také kolorimetrickými metodami². Takto připravené povrchy našly uplatnění v klinické diagnostice pro určení fenotypu haptoglobinu nebo kvantifikaci isoform transferinu pro stanovení chronické závislosti na alkoholu¹⁰.

1.1.3.1. MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie patří mezi analytické techniky umožňující určení molekulové hmotnosti látek na základě poměru jejich hmoty k náboji (m/z). Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor. Nedílnou součástí je zařízení pro zpracování dat.

Při zkoumání biomolekul se často uplatňuje metoda ionizace analytu laserem za přítomnosti matrice, známá pod zkratkou MALDI (z angl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)^{11,12}. Jako matrice se využívají aromatické kyseliny, například deriváty kyseliny skořicové. Princip spočívá ve vzniku krystalů analytu s matricí, ze

kterých jsou následně pomocí laserového impulzu uvolněny ionty. Tímto způsobem ionizace nedochází k fragmentaci a vznikají převážně ionty s jednotkovým nábojem¹³. MALDI je nejběžněji spojena s analyzátozem doby letu (z angl. *Time Of Flight*; TOF). MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie nachází své uplatnění v mnohých oblastech chemie a biologie; umožňuje měření biomolekul o vyšší molekulové hmotnosti, peptidů i celých proteinů¹¹, nebo identifikaci mikroorganismů porovnáním získaného spektra (proteinového profilu) se spektry z databáze¹⁴.

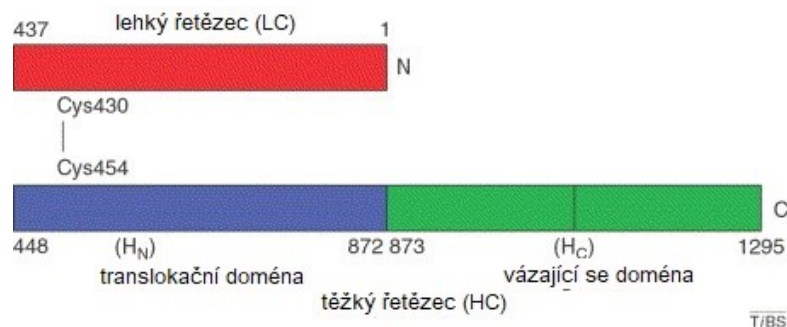
1.2. Botulotoxiny

Botulotoxiny produkovány gram-pozitivními anaerobními bakteriemi *Clostridium botulinum*, *C. baratii* a *C. butyricum*^{15,16,17} představují skupinu bakteriálních proteinových neurotoxinů, které způsobují botulismus. Na základě jejich antigenních vlastností je známých sedm typů botulotoxinů označených písmeny A – G. Pro člověka jsou nebezpečné typy A, B, E a v ojedinělých případech i F^{15,16,18}. Jedná se o vůbec nejsmrtelnější bakteriální toxiny, jelikož smrtelná dávka pro typ A pro člověka při orálním požití činí pouze 1 µg/kg¹⁹. Botuloxiny jsou ale také využívány v řadě léčivých procesů různých onemocnění jako jsou strabismus, cervikální dystonie, migréna, dysfunkce hlasivek apod. Nejčastějším využitím botulotoxinu typu A (BoNT/A) je jeho aplikace v estetické medicíně²⁰.

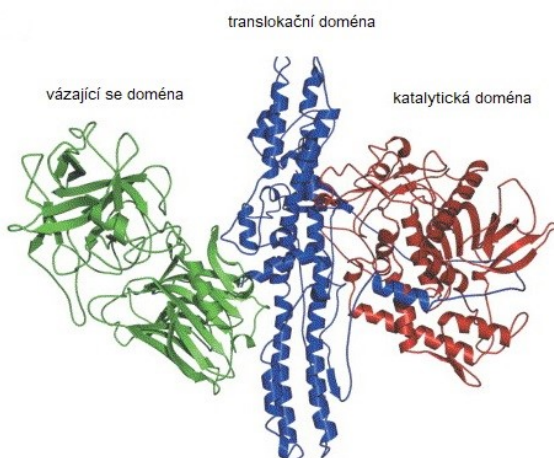
První symptomy intoxikace botulotoxinem jsou pozorovatelné již 12 – 48 hodin po infekci. Hlavním příznakem je ochabnutí svalstva způsobené blokadou uvolnění neurotransmiteru při nervovém zapojení, které se projeví dvojitém viděním, poklesem očních víček a ochabnutím končetin. V některých případech končí smrtí v důsledku selhání respiračního systému¹⁷. U lidí se vyskytuje botulismus ve třech klinických formách rozlišených na základě možných způsobů nakažení, a to buď potravou, poškozenou kožní tkání nebo kolonizací střevního traktu bakteriemi produkujícími botulotoxiny^{18,21}. Léčba využívá antitoxiny, které vážou toxin, jenž se ještě nedostal do buněk nervové soustavy; nejsou ale schopny proniknout do buněk infikovaných a zvrátit tak paralýzu¹⁷.

1.2.1. Endopeptidasová aktivita botulotoxinů

Botulotoxiny jsou produkovány jako jedno-řetězcový polypeptid, který obsahuje 150kDa neurotoxin a další komponenty určené k jeho ochraně a usnadnění absorpce do buňky. Aktivní neurotoxin je složen z lehkého (50 kDa) a těžkého řetězce (100 kDa) spojených disulfidickým můstkem (viz Obr. 4). Těžký řetězec je tvořen dvěma doménami, C-koncovou odpovědnou za navázání na membránu neuronu a N-koncovou odpovědnou za translokaci. Lehký řetězec pak zprostředkuje následné štěpení (viz Obr. 5)^{16,22}.



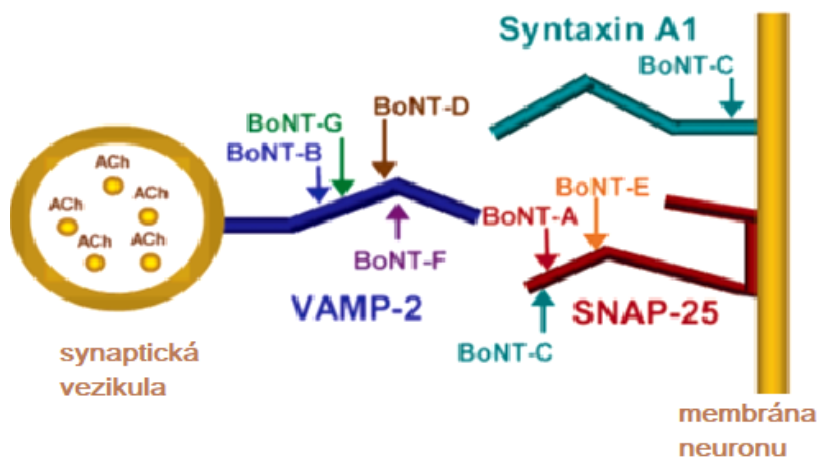
Obr. 4: Dvou-řetězcová struktura aktivního botulotoxinu typu A (BoNT/A). Lehký a těžký řetězec jsou propojeny jednou disulfidickou vazbou. Převzato a upraveno²³.



Obr. 5: Krystalová struktura botulotoxinu typu A (BoNT/A). Na obrázku jsou znázorněny tři domény toxinu – katalytická (červená, tvoří lehký řetězec), translokační (modrá, N-koncová doména těžkého řetězce) a vazná (zelená, C-koncová doména těžkého řetězce). Převzato a upraveno²³.

Z hlediska enzymové aktivity jsou botulotoxiny metaloproteasy závislé na přítomnosti zinečnatého kationu, Zn^{2+} . Jejich endopeptidasová aktivita spočívá ve štěpení

alespoň jednoho ze tří proteinů SNARE komplexu umožňujícího spojení neuronů a jejich komunikaci. SNARE komplex je tvořen proteiny SNAP-25, VAMP-2 a Syntaxin A1. Každý ze sedmi typů botulotoxinů rozpoznává jiné místo štěpení proteinu. Jednotlivá místa štěpení mohou být v některých případech od sebe vzdáleny pouze o jednu aminokyselinu (viz Obr. 6). Jestliže dojde k rozštěpení alespoň jednoho z proteinů tohoto komplexu, nedochází k uvolnění neurotransmiteru acetylcholinu ze synaptické vezikuly, což vede k blokaci svalové kontrakce²⁴.



Obr. 6: SNARE komplex a jeho proteiny se znázorněnými aktivními místy pro jednotlivé typy botulotoxinů. Převzato a upraveno²⁵.

1.2.2. Detekce botulotoxinů

Kvůli extrémní toxicitě botulotoxinů je důležité včasné stanovení nejenom jejich přítomnosti, ale i typu a případné aktivity. Dnes je známých několik metod používaných k tomuto účelu, které se liší svou citlivostí, časovou náročností i spotřebou vzorků či laboratorních zvířat.

1.2.2.1. Testy na myších

Testy na myších jsou v dnešní době jedinou obecně akceptovanou metodou pro stanovení přítomnosti aktivních botulotoxinů jak v klinických vzorcích, tak v potravě²⁵. Jejich výhoda spočívá v poměrně velké citlivosti a možnosti kvantifikace toxinu na základě známé myši letální dávky pro 50 % zkoumané populace (MLD₅₀; její hodnota pro BoNT/A je 10 pg)²⁶. Tato metoda má některé nevýhody jako je limitující výběr používaných myší, velká spotřeba vzorků i myší a experimentální a finanční náročnost.

Další nevýhodou je dlouhá doba potvrzení přítomnosti toxinu a jeho typu vyžadující až několik dní²⁵.

1.2.2.2. ELISA

Zkratka ELISA pochází z anglického výrazu *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* a jedná se o *in vitro* metodu, která využívá vysoce specifické vazby mezi antigenem a protilátkou. Je to jedna z nejvíce využívaných imunometod pro stanovení botulotoxinů. V klasickém „sendvičovém“ uspořádání jsou využity dvě protilátky – jedna, která naváže toxin ze vzorku a druhá, která je konjugovaná s enzymem. Daný enzym po detekci imobilizovaného toxinu vyvolá chemickou reakci, při které dojde k barevné změně substrátu. Tato změna je dále spektroskopicky kvantifikována¹⁷. Metoda byla využita například ke stanovení botulotoxinu typu B (BoNT/B) v jídle (přirozeně i uměle infikovaném toxinem) a to tak, že nejdříve došlo k izolaci toxinu pomocí protilátky, následně ke štěpení substrátu a posléze k detekci produktů této reakce pomocí protilátek metodou ELISA²⁷.

1.2.2.3. Fluorogenní peptidy

Další metoda použitá k detekci BoNTs byla založena na sledování fluorescence fluorogenních substrátových peptidů, která se zvyšovala po jejich štěpení toxinem²⁸. Nevýhodou této metody je nižší citlivost oproti testům na myších a nemožnost její aplikace na vzorky krve či potravy. Také byla pozorována zvýšená tendence falešné pozitivní odezvy v důsledku přítomnosti různých proteas ve vzorku²⁹.

Obě metody, ELISA i použití fluorogenních peptidů, se sice vyznačují časovou nenáročností a jednoduchým provedením, nerozlišují však aktivní a inaktivní formu toxinu a neumožňují souběžné stanovení více typů botulotoxinů. I kdybychom byli schopni tyto metody rozšířit na stanovení více typů, pořád je tu skutečnost, že aktivní místa některých toxinů jsou od sebe vzdáleny pouze o jeden aminokyselinový zbytek. Bylo by tedy náročné vytvořit fluorogenní peptid, který by byl schopen rozlišit takto podobné toxiny, nebo protilátku schopnou detekce těchto produktů. Těmito metodami je možné navíc stanovit jen čtyři ze sedmi typů botulotoxinů²⁵.

1.2.2.4. Endopep-MS

S vývojem a rozmachem hmotnostní spektrometrie a jejím širokým spektrem využití bylo její zapojení do této problematiky jen otázkou času. Vzhledem k schopnosti rozpoznávat i malé odchylky v molekulové hmotnosti byl překonán problém, se kterým se potýkaly metody ELISA a metody využívající fluorogenní peptidy.

Metoda představená skupinou Johna Barra je založena na endopeptidasové aktivitě botulotoxinů, z čeho vyplývá i její název Endopep-MS^{25,30}. I když pro člověka nejsou nebezpečné všechny typy těchto toxinů, Endopep-MS byla jako první *in vitro* metoda schopna rozlišit všechny typy, a to při použití pouze čtyř substrátových peptidů. Vzniklé produkty štěpení byly následně detekovány pomocí MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie nebo LC-ESI-MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem ve spojení s kapalinovou chromatografií)²⁵.

Zajímavou alternativou této metody je nabohacení toxinu ze vzorku pomocí protilátek proti příslušnému typu toxinu imobilizovaných na streptavidinových magnetických kuličkách a jejich následná interakce s reakční směsí obsahující substrátový peptid³¹. Substrátový peptid imituje část proteinu ze SNARE komplexu rozpoznávaný příslušným typem botulotoxinu³⁰. Štěpením biotinylovaného substrátového peptidu toxinem dochází k vytvoření dvou peptidů, které jsou biotinylované na N- resp. C-konci. Tyto peptidové produkty se poté váží na jeden ze tří biotin-vázajících proteinů, jakými jsou avidin, neutravidin nebo streptavidin^{30,32}.

2.Cíl práce

Nalezení vhodných podmínek pro detekci botulotoxinové aktivity pomocí afinitních nosičů v kombinaci s hmotnostní spektrometrií.

- výběr vhodného biotin-vázacího proteinu deponovaného na povrch
- optimalizace podmínek měření (výběr MALDI matrice, nastavení počtu pulzů laseru hmotnostního spektrometru)
- stanovení limitu detekce peptidových produktů BoNT/A aktivity

3. Experimentální část

3.1. Seznam použitého materiálu a přístroje

3.1.1. Přístroje a pomůcky

- analytické váhy *Mettler Toledo, Švýcarsko*
- automatické pipety *Mettler Toledo, Švýcarsko*
- depoziční zařízení *Mikrobiologický ústav AV ČR, ČR*
- digitální multimetr Fluke 179 TRUE RMS *Fluke networks, USA*
- hmotnostní spektrometr MALDI/TOF AutoflexSpeed *Bruker Daltonics, Německo*
- laminární box biohazard BSC-EN 2-4 *MERCI, ČR*
- mikrostříkačka Hamilton 250 μ l *Hamilton, Švýcarsko*
- pH metr Orion2 Star *Thermo Scientific, USA*
- skleněné povrchy s oxidem indium a titánu (ITO; $\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$) *Bruker Daltonics, Německo*
- sonikační lázeň Sonorex RK52H *Bandelin, Německo*
- stolní centrifuga miniSpin *Eppendorf, Německo*
- ThermoMixer C *Eppendorf, Německo*
- vortex Wizard *Velp Scientifica, Itálie*

3.1.2. Chemikálie

- 1,4-dithiothreitol (DTT) *Serva, Německo*
- 2-merkaptobenzothiazol (MBT) *Sigma-Aldrich, USA*
- avidin *Thermo Scientific, USA*
- acetonitril, HiPerSolv CHROMANORM *VWR International, USA*
- ethanol *Lach-ner, ČR*
- hydrogenuhličitan amonný *Sigma-Aldrich, USA*
- hovězí sérový albumin (BSA) *Serva, Německo*
- chlorid zinečnatý *Sigma-Aldrich, USA*
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA) *Bruker Daltonics, Německo*

- kyselina ferulová (FA) *Sigma-Aldrich, USA*
- kyselina trifluoroctová (TFA) *Sigma-Aldrich, USA*
- methanol *Lach-ner, ČR*
- *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-(2-ethansulfonová kyselina) (HEPES) *Sigma-Aldrich, USA*
- neutravidin *Thermo Scientific, USA*
- peptidový kalibrační standard II *Bruker Daltonics, Německo*
- rekombinantní botulotoxin A (BoNT/A) *Ústřední vojenská nemocnice, ČR*
- streptavidin *Thermo Scientific, USA*
- voda, LiChrosolv (LC-MS kvalita) *Merck, Německo*

3.1.3. Peptidový standard pro BoNT/A

- substrátový peptid pro BoNT/A *Peptide 2.0, USA*
K*GSNRTRIDQGNQRATRLGK*
- C-koncový peptid *Peptide 2.0, USA*
RATRLGK*
- N-koncový peptid *Peptide 2.0, USA*
K*GSNRTRIDQGNQ
(* biotin)

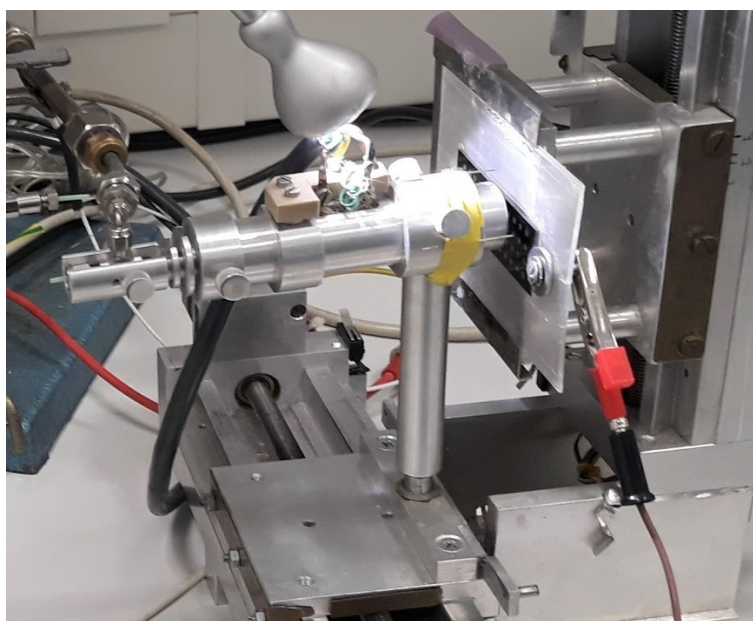
3.1.4. Pufry

- pufr pro depozici proteinů a oplachy povrchů
20mM hydrogenuhličitan amonný, pH 7,9 (pro depozici objem 80 ml, pro oplachy 1 l)
- reakční pufr
5mM HEPES, 10μM ZnCl₂, 10mM DTT, 1 mg ml⁻¹ BSA (přidáno krátce před použitím), pH 7,3 (objem 40 ml)

3.2. Experimentální metody

3.2.1. Příprava afinitních nosičů

Povrchy ITO byly modifikovány vždy jedním ze tří biotin-vázajících proteinů – avidin, neutravidin, streptavidin. Do přístroje pro depozici (Obr. 7) byl umístěn povrch určený k modifikaci s maskou nalepenou na jeho vodivé straně. Masky poskytla jednotnou velikost, rozmístění a počet modifikovaných bodů. V tomto experimentu byly na jednom ITO skleněném povrchu (o rozměrech $75 \times 25 \times 1,1$ mm) čtyři řady bodů po dvanácti o průměru 2 mm. Jednotlivé body byly od sebe vzdáleny 5,4 mm. Tyto údaje (kromě velikosti bodu) spolu s časovým údajem o setrvání na jedné pozici (v sekundách) byly zadány do programu ovládajícího posuvný modul přístroje.



Obr. 7: Přístroj pro modifikaci povrchů metodou měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku.

Ze zásobních $50\mu\text{M}$ vodných roztoků (LC-MS kvalita použité vody) byly připraveny roztoky jednotlivých proteinů (avidin, neutravidin a streptavidin) o koncentraci $10\text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ ředěné v 20 mM pufru hydrogenuhličitanu amonného (pH 7,9). Pumpou s $250\mu\text{l}$ mikrostříkačkou byl proteinový roztok dopraven do elektrospreje s průměrem kapiláry $20\text{ }\mu\text{m}$ průtokovou rychlostí $1\text{ }\mu\text{l min}^{-1}$. Na spojení s kapilárou elektrospreje bylo přiváděno napětí $+1,5\text{ kV}$ z vnějšího vysokonapětového zdroje. Jako

nosný plyn byl použit plynný dusík přehříváný na teplotu 45 °C. K dehydrataci iontů sloužila desolvatační trubice dlouhá 10 cm (průměr 4 mm), uzemněná a vyhřátá na 45 °C. Desolvatované, kladně nabitě ionty byly deponovány na ITO skleněný povrch, na který bylo vloženo napětí – 1,5 kV pomocí externího vysokonapěťového zdroje. Doba depozice pro jednotlivé body povrchu byla 300 s. Po ukončení depozice byla z povrchu odstraněna maska (modifikované pozice byly zvýrazněny z nevodivé strany popisovačem), příslušný povrch byl deionizovanou vodou omyt (5 – 10 min) a ponechán uschnout.

3.2.2. Reakce na afinitních nosičích

3.2.2.1. Práce s peptidovým standardem pro BoNT/A

Byly připraveny zásobní roztoky substrátového peptidu pro botulotoxin A i jeho štěpných produktů ve vodě (LC-MS kvalita) o koncentraci 2 mg ml⁻¹. Z nich byly podle tabulky Tab. 1 připraveny roztoky v reakčním pufru o koncentraci 10 pmol μl⁻¹, které byly následně ředěny trojkovou ředící řadou do nejnižší koncentrace 0,01 pmol μl⁻¹. Celkový počet těchto roztoků byl sedm a jejich koncentrace (v jednotkách pmol μl⁻¹) byla následující: 10,00; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,04 a 0,01.

Tab. 1: Shrnutí údajů o jednotlivých peptidech standardu pro BoNT/A (název a sekvence) a údajů potřebných pro přípravu jejich roztoků o koncentraci 10 pmol μl⁻¹ (koncentrace zásobních roztoků těchto peptidů (c_0), jejich molekulová hmotnost (M) a potřebné objemy zásobních roztoků (V_0) i reakčního pufru (V_{pufr})).

peptid	c_0 pmol μl ⁻¹	M Da	V_0 μl	V_{pufr} μl
substrátový				
K*GSNRTRIDQGNQRATRLLGGK*	350	2878,9	2	68
C-koncový				
RATRLLGGK*	1580	1197,9	1	157
N-koncový				
K*GSNRTRIDQGNQ	780	1699,7	1	154

* biotin

V Petriho misce byly na modifikované body povrchu postupně za sebou pipetovány jednotlivé roztoky peptidového standardu pro BoNT/A (včetně roztoků ředící

řady) v triplicátech o objemu 1 μl . Tyto povrchy byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě ve vlhké komoře, která byla vytvořena v Petriho misce pomocí mokřých ubrousků. Po uplynutí inkubační doby byly povrchy opláchnuty ($5\times$ pufrém pro oplachy a $3\times$ destilovanou vodou) a ponechány uschnout.

3.2.2.2. MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie

V rámci této práce byly použity tři matrice – kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA), kyselina ferulová (FA) a 2-merkaptobenzothiazol (MBT). Testy byly prováděny na neutravidinových površích, přičemž se lišil i způsob přípravy roztoků matric; v prvním případě bylo na povrch pipetováno 0,7 μl roztoku matrice s přídavkem kyseliny trifluoroctové (TFA) (není vždy stejný), v druhém byl na povrch nejdříve nanesen 1 μl 1% roztoku TFA v 50% acetonitrilu a po uschnutí převrstven 0,7 μl roztoku matrice již bez obsahu TFA. Příprava CCA matrice spočívala v sonikaci nasyceného roztoku v methanolu po dobu 5 min, centrifugaci 30 s při $12\ 100\times$ g a smíchání supernatantu s 50% acetonitrem s 0,3% TFA v poměru 1:2. Pro použití matric MBT a FA byl připraven jejich roztok v 50% acetonitrilu s 0,3% TFA o koncentraci 10 mg ml^{-1} .

K identifikaci nabohacených peptidů byly povrchy umístěny do držáku kompatibilního s MALDI/TOF hmotnostním spektrometrem AutoflexSpeed. Přístroj byl kalibrován pomocí peptidového kalibračního standardu (Peptide calibration standard II od společnosti Bruker Daltonics). Měření bylo prováděno v pozitivním módu s náhodným krokováním terčíku (z angl. *random walk*) při frekvenci laseru 2 000 Hz a celkovém počtu laserových pulzů 10 000 nebo 20 000. Detekční rozsah byl m/z 800 – 4 000. Získaná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

3.2.2.3. Práce s toxinem BoNT/A

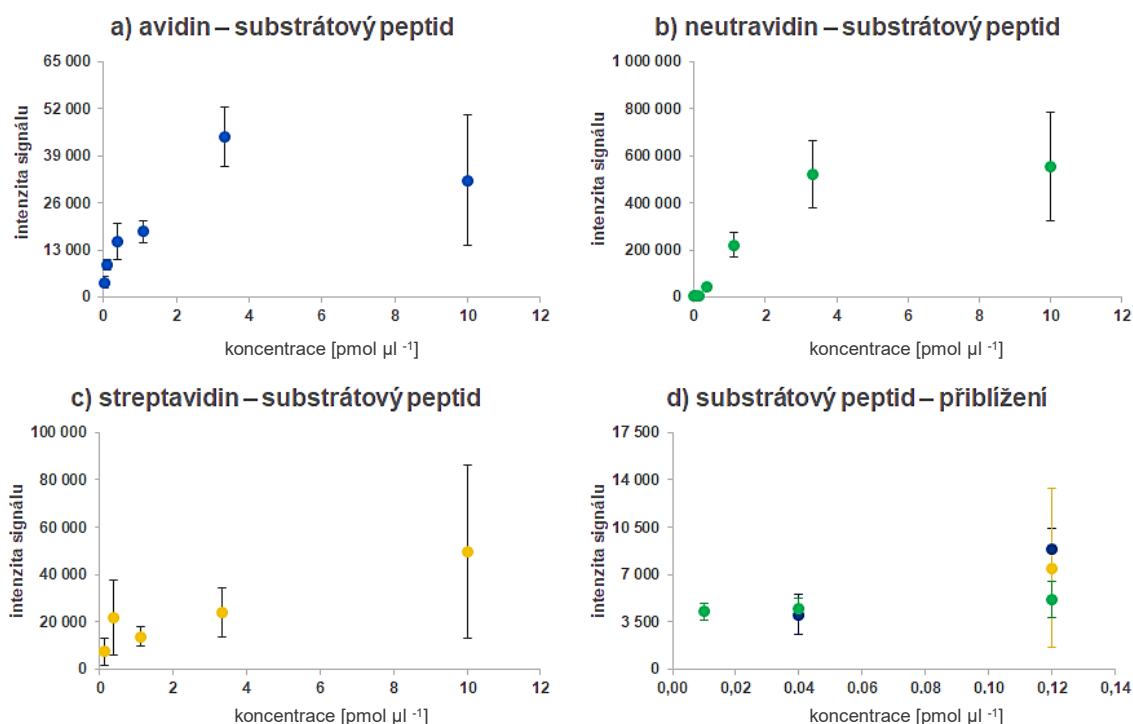
Po vyhodnocení údajů z experimentů se standardními peptidy byly pro analýzu reakčních produktů BoNT/A reakce připraveny povrchy s avidinem a neutravidinem (postup shodný s podkapitolou 3.2.1. („Příprava afinitních nosičů“)). Byl připraven roztok substrátového peptidu ($\text{K}^*\text{GSNRTRIDQGNQRATRLLGGK}^*$) pro BoNT/A v reakčním pufru o koncentraci $20\text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$. Dále bylo připraveno pět roztoků BoNT/A o koncentracích 100; 10; 1; 0,1 a $0,01\text{ ng ml}^{-1}$ ředěním toxinu o původní koncentraci

1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ reakčním pufrém. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny smícháním roztoku substrátového peptidu vždy s jedním ředěním toxinu v poměru 1:1. Celkový objem těchto směsí byl 30 μl a výsledná koncentrace substrátového peptidu 10 $\text{pmol } \mu\text{l}^{-1}$. Byl připraven také kontrolní vzorek, kde byl objem toxinu nahrazen reakčním pufrém. Reakční směsi byly inkubovány v termomixeru po dobu 4 hod při teplotě 37 °C a 300 RPM. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 30 s při 12 100 \times g použitím stolní centrifugy MiniSpin. Na opláchnuté a suché povrchy byl pipetován 1 μl vzorků v triplicátech a povrchy byly následně inkubovány 30 min při laboratorní teplotě ve vlhké komoře (Petriho miska s namočenými ubrousky). Po uplynutí této doby byly povrchy 5 \times velmi rychle opláchnuty pufrém (20 mM hydrogenuhličitan amonný, pH 7,9) a 3 \times ve vodě (LC-MS kvalita) a ponechány uschnout. Veškerá práce s toxinem probíhala v laminárním boxu. Po uschnutí byl na povrch nanesen roztok CCA matrice oběma způsoby – v prvním případě 0,7 μl roztoku matrice s přídavkem TFA, v druhém 1 μl 1% TFA a po uschnutí převrstvení 0,7 μl roztoku matrice bez přídavku TFA. Povrchy byly změřeny MALDI/TOF AutoflexSpeed hmotnostním spektrometrem a data byla analyzována v programu FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). Počet pulsů hmotnostního spektrometru byl 10 000, další nastavení viz kapitola 3.2.2.2. („MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie“).

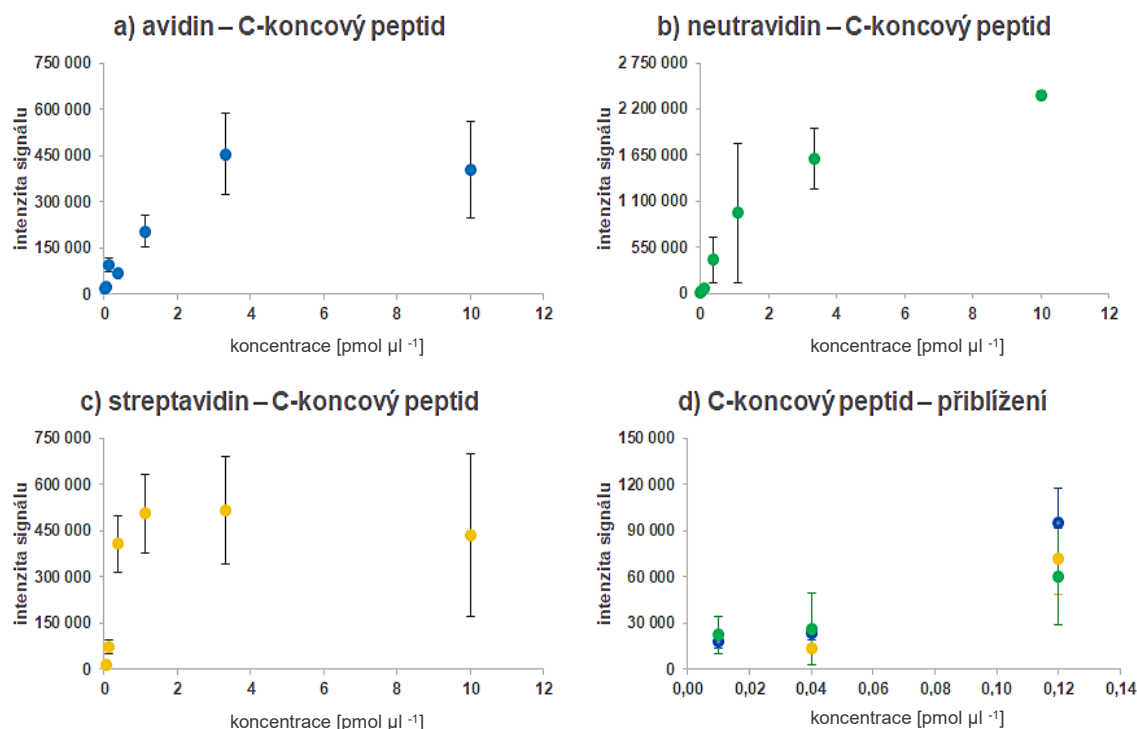
4. Výsledky

Výběr vhodného biotin-vázacího proteinu deponovaného na povrch

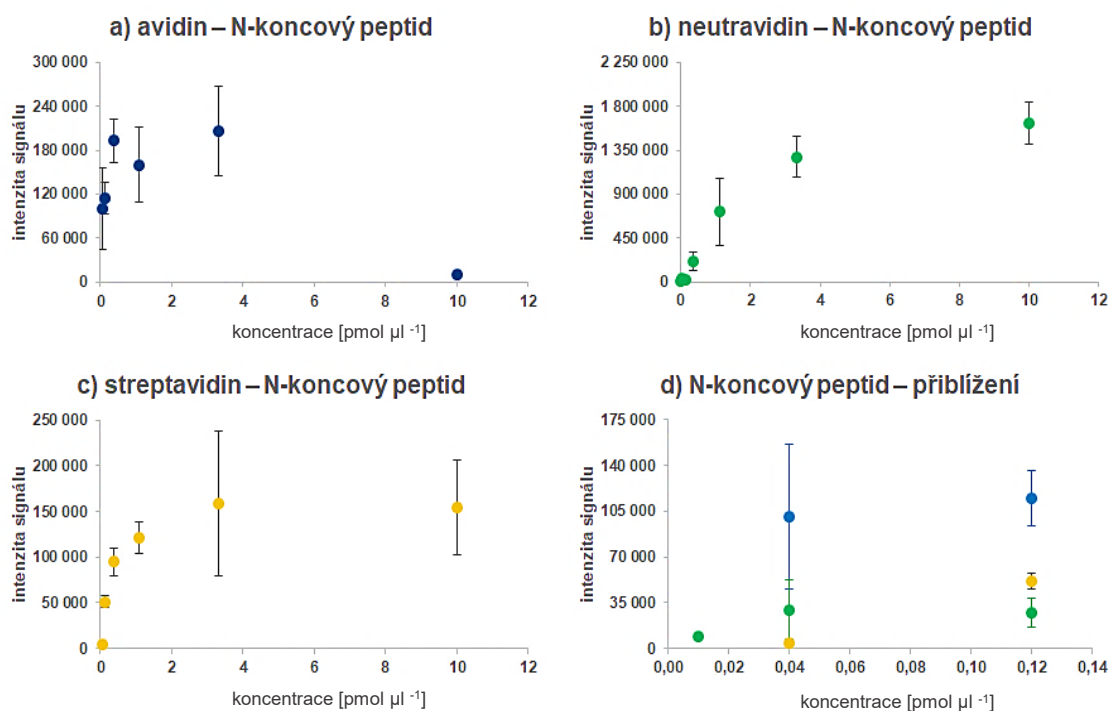
Na připravených avidinových, neutravidinových a streptavidinových površích byly provedeny reakce s peptidovým standardem pro BoNT/A. Příslušné grafy pro daný modifikovaný povrch (resp. daný biotin-vázací protein) a peptid standardu byly zhotoveny vynesáním intenzity signálu pro daný peptid proti jeho koncentraci ve vzorku (viz Obr. 8, 9, 10).



Obr. 8: Grafy závislosti intenzity signálu substrátového peptidu na jeho koncentraci ve vzorku pro avidinový (a), neutravidinový (b) a streptavidinový povrch (c). Graf (d) zobrazuje přiblížení na tři nejnižší koncentrace substrátového peptidu ve vzorku pro všechny tři povrchy.



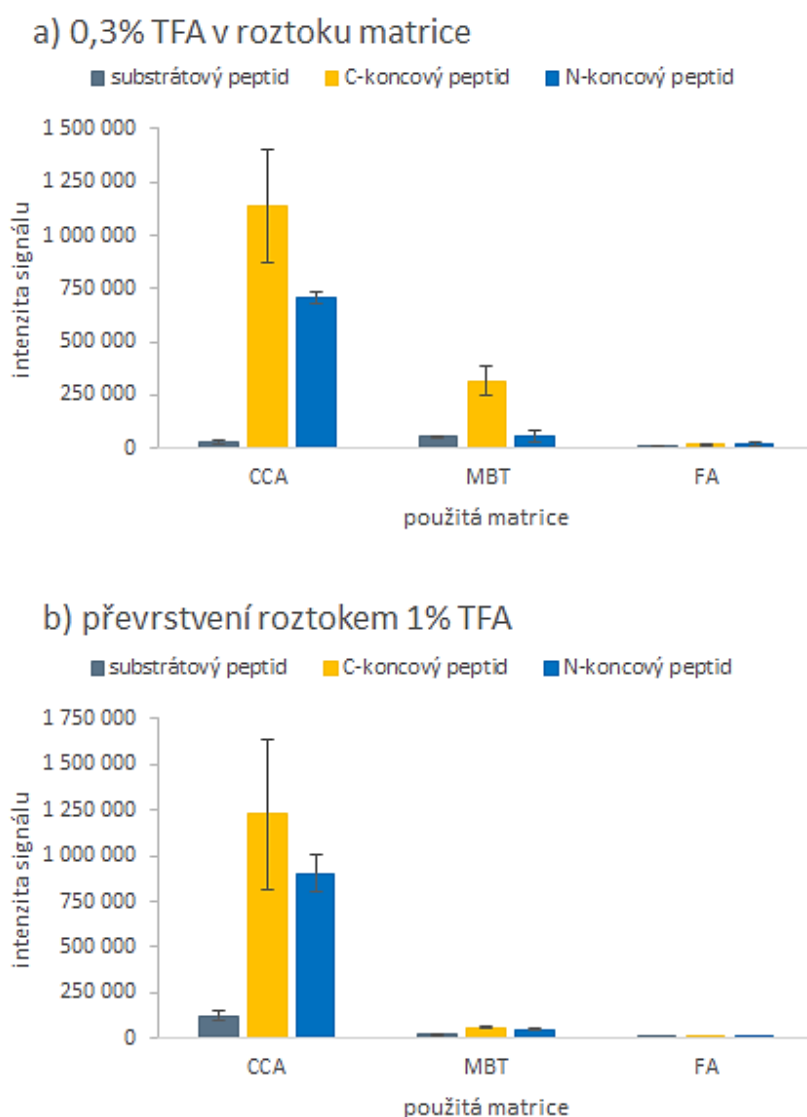
Obr. 9: Grafy závislosti intenzity signálu C-koncového peptidu na jeho koncentraci ve vzorku pro avidinový (a), neutravidinový (b) a streptavidinový povrch (c). Graf (d) zobrazuje přiblížení na tři nejnižší koncentrace substrátového peptidu ve vzorku pro všechny tři povrchy.



Obr. 10: Grafy závislosti intenzity signálu N-koncového peptidu na jeho koncentraci ve vzorku pro avidinový (a), neutravidinový (b) a streptavidinový povrch (c). Graf (d) zobrazuje přiblížení na tři nejnižší koncentrace substrátového peptidu ve vzorku pro všechny tři povrchy.

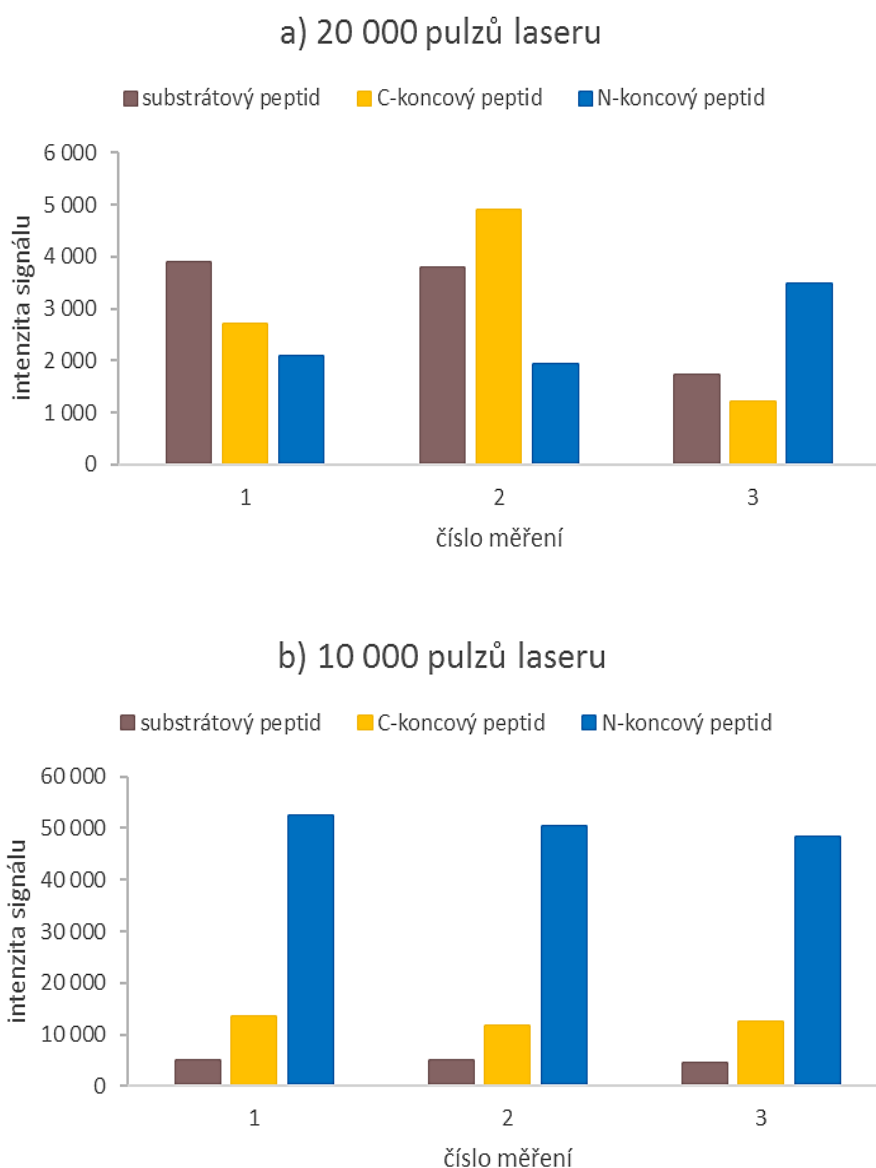
Optimalizace podmínek měření

Prvním krokem v optimalizaci podmínek měření byl výběr vhodné matrice. Tři MALDI matrice – CCA, MBT a FA – byly testovány na neutraavidinových površích, přičemž se lišil i postup v jejich přípravě. V jednom z postupů byla TFA přítomna přímo v roztoku matrice, v druhém došlo nejprve k přidání TFA na povrch a po uschnutí k převrstvení matricí. Měření bylo prováděno v triplikátech a získaná data zpracována do grafů závislosti intenzity signálu na typu použité matrice (viz Obr. 11).



Obr. 11: Grafy porovnání intenzity signálu jednotlivých peptidů standardu pro BoNT/A při použití různých MALDI matric (CCA, MBT, FA) kdy se lišil způsob jejich přípravy. V jednom případě se TFA nacházela přímo v roztoku matrice (a), v druhém byl nejdříve 1% roztok TFA nanesen na povrch a po uschnutí převrstven matricí (b).

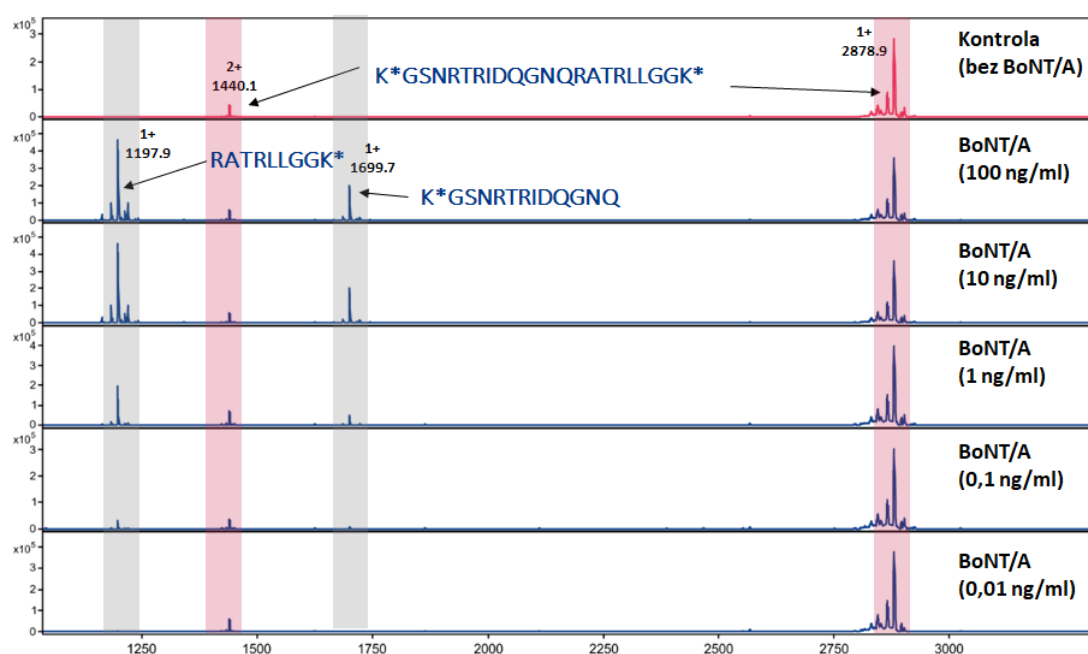
Jako další byl volený vhodný počet pulzů laseru, kdy jednotlivé body neutravidinových povrchů po reakci s peptidovým standardem pro BoNT/A byly v hmotnostním spektrometru 3× za sebou analyzovány vždy pro 10 000 nebo 20 000 laserových pulzů. Získané údaje byly vyhodnoceny do podoby příslušných grafů zobrazujících intenzitu jednotlivých peptidů standardu v rámci jednotlivých měření triplikátů (viz Obr. 12).



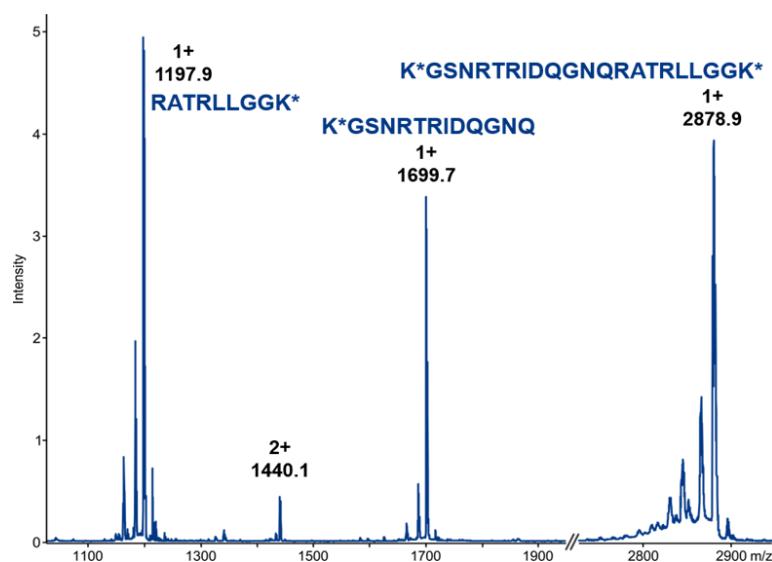
Obr. 12: Grafy závislosti intenzity signálu jednotlivých peptidů standardu pro BoNT/A na daném měření v rámci triplikátů při počtu laserových pulzů 20 000 (a) a 10 000 (b).

Stanovení limitu detekce peptidových produktů BoNT/A aktivity

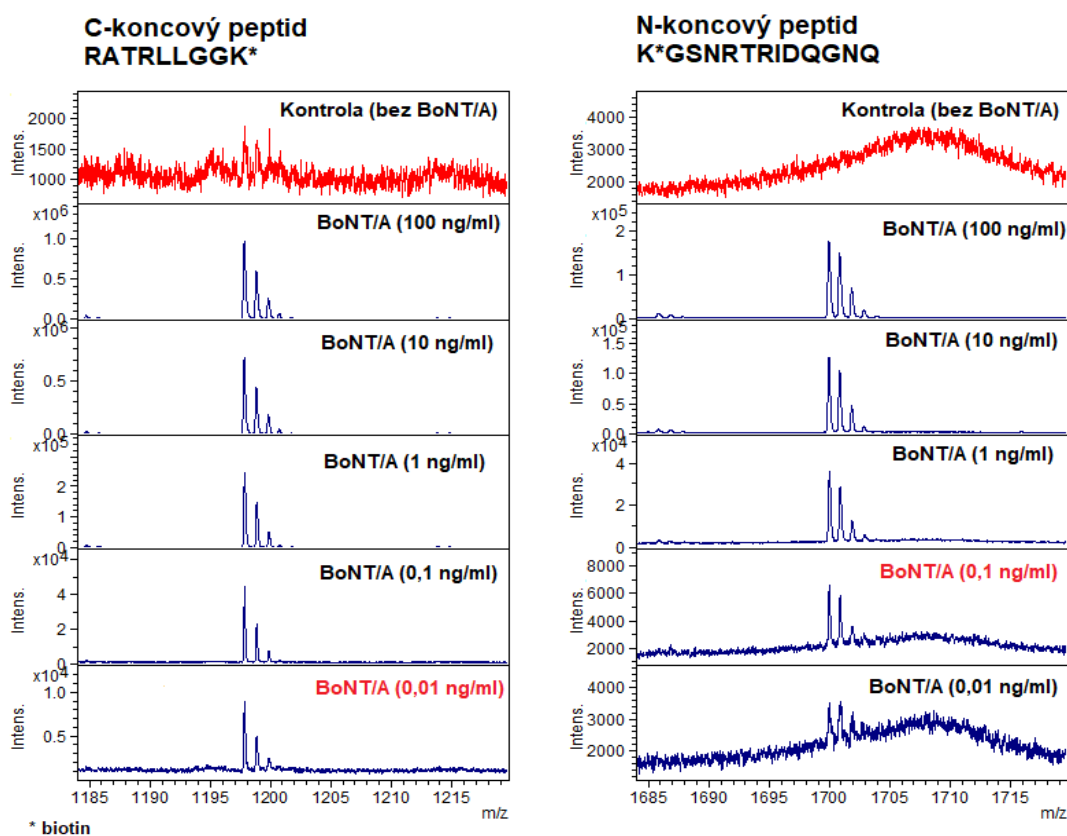
Po provedení jednotlivých reakcí s toxinem v rámci stanovení limitu detekce peptidových produktů jeho aktivity byly neutravidinové povrchy s navázanými peptidy změřeny MALDI/TOF hmotnostním spektrometrem. V získaných spektrech všech reakcí, byly nalezeny jak produkty štěpení (C- a N-koncový peptid), tak peptid substrátový (viz Obr. 13, 15). Obrázek 14 představuje spektrum nabohacených peptidů po inkubaci s BoNT/A o koncentraci 100 ng ml⁻¹. Závislost intezity jednotlivých produktových peptidů vzniklých štěpením BoNT/A na jeho koncentraci jsou znázorněny na Obr. 16 (str. 31). Spektrum z avidinového povrchu (reakční směs s toxinem o koncentraci 100 ng ml⁻¹), který nebyl pro nabohacení peptidových produktů BoNT/A dále použit z důvodu neznámé kontaminace o m/z 1060,1 je ukázáno na Obr. 17 (str. 31).



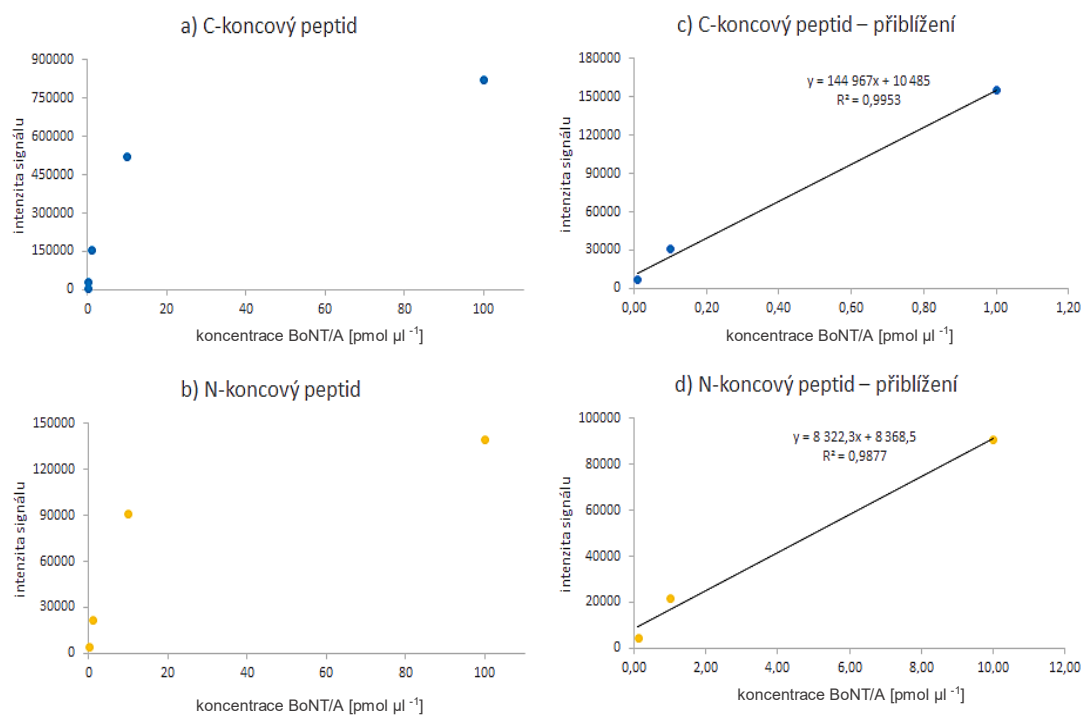
Obr. 13: Získaná spektra produktů reakčních směsí obsahujících BoNT/A o různých koncentracích nabohacených na neutravidinovém povrchu. Kontrola představuje reakční směs bez toxinu.



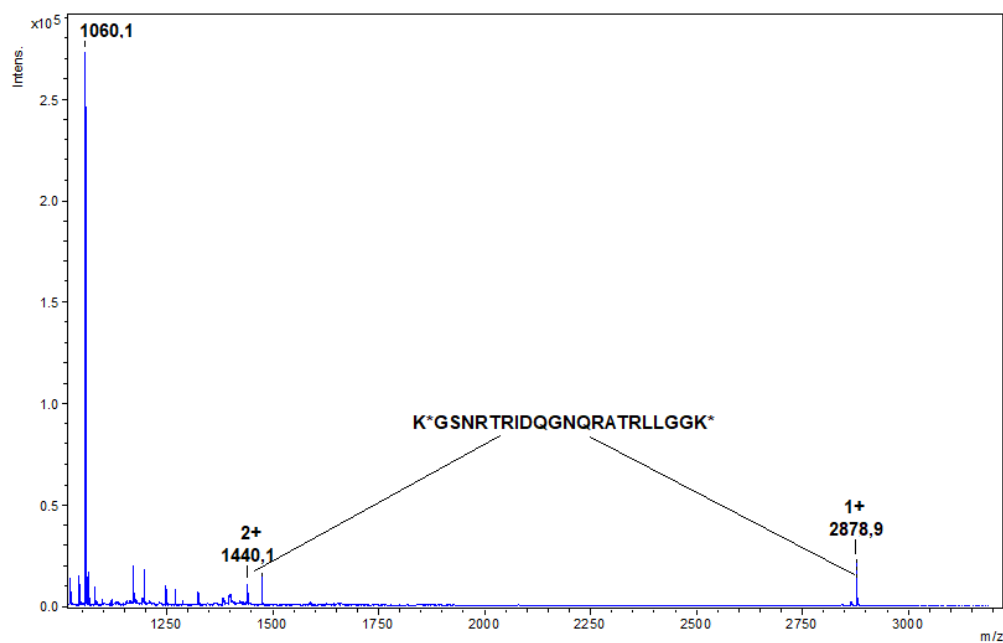
Obr. 14: Spektrum nabohacených peptidů po inkubaci s BoNT/A o koncentraci 100 ng ml⁻¹.



Obr. 15: Přiblížení na C-koncový a N-koncový peptid pro jednotlivé koncentrace BoNT/A. Spektra produktů o koncentracích BoNT/A 0,01 ng/ml (pro C-koncový peptid) a 0,1 ng/ml (pro N-koncový peptid) představují limitní koncentrace toxinu, při kterých je poměr signálu k šumu (S/N) pro jednotlivé peptidy vyšší než 10.



Obr. 16: Závislosti intenzity signálu na koncentraci BoNT/A pro C-koncový (a) a N-koncový peptid (b). Grafy c) a d) představují přiblížení na lineární oblast křivky pro daný peptid.



Obr. 17: Spektrum nabohaceného substrátového peptidu z reakční směsi s koncentrací toxinu 100 ng ml^{-1} na povrchu s imobilizovaným avidinem.

5. Diskuze

Botulotoxiny jsou řazeny mezi jedny z nejvíce smrtelných, doposud známých, proteinových jedů. Typ A, na který je zaměřena tato práce, je nejčastější příčinou botulismu u člověka, a jelikož je schopen setrvat v aktivní formě po dobu až několik měsíců, byl klasifikován jako potenciální hrozba ve spojení s bio-terorismem¹⁹. Potýkáme se tedy se snahou vyvinout metodu, která by byla schopna co nejrychleji stanovit nejenom přítomnost toxinu, ale i jeho typ. Cílem této práce bylo nalezení vhodných podmínek pro stanovení limitu detekce peptidových produktů aktivity BoNT/A na afinitních nosičích v kombinaci s MALDI hmotnostní spektrometrií.

Prvním krokem byla příprava afinitních nosičů pomocí imobilizace tří proteinů s vysokou afinitou k biotinu – avidin, neutravidin a streptavidin. Tyto proteiny byly zvoleny na základě použitého substrátového peptidu pro BoNT/A (K*GSNRTRIDQGNQRATRLGK*), který byl značený na obou koncích biotinem (*). Sekvence substrátového peptidu byla navržena a optimalizována v laboratoři dr. Barra³⁰ na základě sekvence proteinu SNAP-25. Na připravených površích modifikovaných avidinem, neutravidinem a streptavidinem byla stanovována účinnost nabohacení a detekce jednotlivých peptidů standardu. Na základě dat získaných z MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie byly sestaveny grafy závislosti intenzity signálů jednotlivých peptidů na jejich koncentraci (viz Obr. 8, 9, 10, str. 25, 26), přičemž byly zahrnuty pouze signály s hodnotou S/N větší než 10. Z grafů lze usoudit, že závislost intenzity signálů na koncentraci peptidů je lineární v koncentračním rozmezí 0,01 až 1,11 pmol μl^{-1} ; při vyšších koncentracích dochází již k nasycení povrchu. Dále je z grafů ukazujících detail třech nejnižších koncentrací (0,12; 0,04 a 0,01 pmol μl^{-1}) vidět, že substrátový a oba N- i C-koncové peptidy byly o nejnižší koncentraci (0,01 pmol μl^{-1}) detekovány pouze při použití neutravidinového povrchu. Avidinový povrch vykazující podobnou citlivost jako povrch neutravidinový byl z dalších experimentů vyloučen z důvodu přítomnosti neznámé kontaminace pozorované o m/z 1060,1 (viz Obr. 17, str. 31).

Jelikož byly peptidy nabohacené na površích zkoumány pomocí MALDI/TOF hmotnostní spektrometrie, bylo potřebné optimalizovat i podmínky samotného měření.

Pro tyto účely byly nejprve testovány jednotlivé MALDI matrice a způsob jejich přípravy. Dále byl optimalizován celkový počet pulzů laseru hmotnostního spektrometru pro jednotlivá měření na každém bodu povrchu.

Ze tří testovaných matric (CCA, MBT a FA) obecně vhodných pro měření peptidů byla na základě získaných dat (viz Obr. 11, str. 27) vybrána jako nejlepší CCA matrice, a to na základě intenzit signálů pro jednotlivé peptidy standardu, které byly o několik řádů vyšší než u ostatních matric. Z experimentů optimalizace nanosení matrice se jako nejvýhodnější jeví způsob, při kterém byl na povrch nejdříve aplikován roztok 1% TFA, který byl po uschnutí převrstven matricí již bez přídavku TFA (viz Obr. 11 b), str. 27). Ačkoliv se data z obou způsobů nanosení matrice příliš nelišila, při druhém způsobu přípravy vykazovaly naměřené signály peptidů lepší odlišení signálu od šumu, proto byla tato metoda používána v dalších experimentech. Výsledky analýz, při kterých bylo použito rozdílného počtu celkových laserových pulzů na jeden bod povrchu vyplývá, že lepší reprodukovatelnosti bylo dosaženo při použití 10 000 pulzů (viz Obr. 12, str. 28). Větší počet pulzů již nepřispěl k vyšší intenzitě signálů peptidů, naopak docházelo k jejich snižování pravděpodobně v důsledku vypotřebování analytu na dané pozici.

Dalším cílem práce bylo stanovení limitu detekce peptidových produktů endopeptidasové aktivity BoNT/A. Obrázek 14 (str. 30) je „vzorovým“ spektrem nabohacených peptidů reakční směsi o koncentraci toxinu 100 ng ml⁻¹ na neutravidinovém povrchu. Hmotnostní spektra po nabohacení a detekci produktů jednotlivých reakčních směsí a přiblížení na jednotlivé produkty (peptidy) botulotoxinové aktivity jsou znázorněny na obrázcích 13 a 15 (str. 29, 30). V červeně vyznačeném spektru kontrolní směsi, kde se nenacházel žádný toxin, byl pozorován pouze substrátový peptid ve dvou nábojových stavech – jedenkrát nabitý ($m/z = 2878,9$) a dvakrát nabitý ($m/z = 1440,1$). V oblasti C-koncového peptidu lze v kontrolním spektru pozorovat i velmi slabý signál patřící nejspíše C-koncovému peptidu. Možným vysvětlením může být kontaminace pozice produkty BoNT/A štěpení nacházejících se v sousedních pozicích. Analýza reakčních směsí s přídavkem toxinu potvrdila přítomnost peptidových produktů BoNT/A aktivity, které byly pozorovány jako signály o m/z 1197,9 patřící biotinem značenému C-koncovému peptidu a jako signály o m/z 1699,7 patřící biotinem značenému N-koncovému peptidu. Se snižující se koncentrací BoNT/A v reakční směsi

byl pozorován i pokles intenzity signálů jednotlivých produktových peptidů (Obr. 13 a 15, str. 29, 30). Z křivky závislosti intenzity signálu C- a N-koncového peptidu na koncentraci BoNT/A (viz Obr. 16, str. 31) lze spekulovat i o možném stanovení množství BoNT/A v reálném vzorku. Přesná kvantifikace BoNT/A by nejspíše vyžadovala použití značeného substrátového peptidu zaneseného do vzorku. Limitní hodnota koncentrace BoNT/A, při kterém byl S/N pro jednotlivé peptidy vyšší než 10, byla pro C-koncový peptid $0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ ($S/N = 14,5$), a pro N-koncový peptid $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ ($S/N = 15,5$). Avidinové povrchy nebyly k tomuto stanovení využity z důvodu výskytu kontaminace o $m/z = 1060,1$ (viz Obr. 17, str. 31). Jelikož je limitní koncentrace BoNT/A pro klinická stanovení v praxi $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$, jeví se metoda afinitních povrchů popsaná v této práci jako potenciálně úspěšná pro sledování přítomnosti BoNT/A v reálných vzorcích. Další fází testování této metody bude sledování BoNT/A aktivity právě ve vzorcích jako jsou potraviny, krmiva a další.

6. Závěr

V rámci této práce byly úspěšně nalezeny podmínky pro stanovení botulotoxinové aktivity pomocí afinitních nosičů v kombinaci s MALDI/TOF hmotnostní spektrometrií. Jelikož substrátový peptid pro zkoumaný botulotoxin A byl značen na C- i N-konci biotinem, byl zvolen k modifikaci povrchů protein s vysokou afinitou k biotinu. Ze tří testovaných – avidin, neutravidin a streptavidin, byl vzhledem ke schopnosti detekovat standardní peptidy o nejnižší koncentraci ($0,01 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$) vybrán pro další experimenty neutravidin. Následně byly optimalizovány podmínky měření, konkrétně výběr vhodné matrice a počet laserových pulzů. Ze tří testovaných matric a dvou způsobů jejich přípravy, byla nejvhodnější CCA matrice s převrstvením povrchu 1% roztokem TFA. Počet pulzů laseru 10 000 byl vhodnější z důvodu reprodukovatelnosti dat. Vyhodnocením údajů získaných z experimentů s BoNT/A byl stanoven limit detekce toxinu na $0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ pro C-koncový peptid a na $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ pro N-koncový peptid. Výhodami této metody jsou nejenom vysoká citlivost, ale i robustnost, a hlavně časová nenáročnost.

Použitá literatura

1. Johnson, G. E., Gunaratne, D. & Laskin, J. Soft- and reactive landing of ions onto surfaces: Concepts and applications. *Mass Spectrom. Rev.* **35**, 439–479 (2016).
2. Pompach, P. *et al.* Protein Chips Compatible with MALDI Mass Spectrometry Prepared by Ambient Ion Landing. *Anal. Chem.* **88**, 8526–8534 (2016).
3. Badu-Tawiah, A. K., Wu, C. & Cooks, R. G. Ambient ion soft landing. *Anal. Chem.* **83**, 2648–2654 (2011).
4. Cyriac, J., Pradeep, T., Kang, H., Souda, R. & Cooks, R. G. Low-Energy Ionic Collisions at Molecular Solids. (2012).
5. Laskin, J. & Hu, Q. Reactive Landing of Gramicidin S and Ubiquitin Ions onto Activated Self-Assembled Monolayer Surfaces. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1304–1312 (2017).
6. Volný, M., Elam, W. T., Branca, A. & Ratner, B. D. Preparative Soft and Reactive Landing of Multiply Charged Protein Ions on a Plasma-Treated Metal Surface. **77**, 4890–4896 (2005).
7. Franchetti, V., Solka, B. H., Baitinger, W. E., Amy, J. W. & Cooks, R. G. Soft landing of ions as a means of surface modification. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **23**, 29–35 (1977).
8. Gologan, B. *et al.* Ion soft-landing into liquids: Protein identification, separation, and purification with retention of biological activity. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1874–1884 (2004).
9. Deng, Z. *et al.* A close look at proteins: Submolecular resolution of two- and three-dimensionally folded cytochrome c at surfaces. *Nano Lett.* **12**, 2452–2458 (2012).
10. Darebna, P. *et al.* Detection and quantification of carbohydrate-deficient transferrin by MALDI-compatible protein chips prepared by ambient ion soft landing. *Clin. Chem.* **64**, 1319–1326 (2018).
11. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, (1988).
12. Hillenkamp, F. & Karas, M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 71–77 (2000).
13. Jurinke, C., Oeth, P. & Van Den Boom, D. MALDI-TOF mass spectrometry: A versatile tool for high-performance DNA analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* **26**, 147–163 (2004).
14. Sandrin, T. R., Goldstein, J. E. & Schumaker, S. Bond-Dissociation Energies of Cations — Pushing the. *Mass Spectrom. Rev.* (2012).
15. Lindstrom, M. & Korkeala, H. Laboratory Diagnostics of Botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 298–314 (2006).
16. Montecucco, C., Schiavo, G., Biomediche, S. & Padova, U. MicroReview Mechanism of

- action of tetanus and botulinum neurotoxins. **13**, 1–8 (1994).
17. Čapek, P. & Dickerson, T. J. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. 24–53 (2010).
 18. Centers for Disease Control and Prevention. Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers. (1998).
 19. Arnon, S. S. *et al.* Botulinum Toxin as a Biological Weapon Medical and Public Health Management. *JAMA* **285**, 1059–1070 (2001).
 20. Savino, P. J. & Maus, M. Botulinum Toxin Therapy. *Neurol. Clin.* **9**, 205–224 (1991).
 21. Johnson, E. A. & Montecucco, C. Chapter 11 Botulism. in *Handbook of clinical neurology* **91**, 333–368 (2008).
 22. Fujinaga, Y. *et al.* The haemagglutinin of Clostridium botulinum type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology* **143**, 3841–3847 (1997).
 23. Turton, K., Chaddock, J. A. & Acharya, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins : structure , function and therapeutic utility. *TRENDS Biochem. Sci.* **27**, 552–558 (2002).
 24. Schiavo, G., Matteoli, M. & Montecucco, C. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* **80**, 717–766 (2017).
 25. Boyer, A. E. *et al.* From the mouse to the mass spectrometer: Detection and differentiation of the endoprotease activities of botulinum neurotoxins A–G by mass spectrometry. *Anal. Chem.* **77**, 3916–3924 (2005).
 26. Ferreira, J. L. Comparison of amplified ELISA and mouse bioassay procedures for determination of botulinum toxins A, B, E, and F. *J. AOAC Int.* **84**, 85–88 (2001).
 27. Wictome, M. *et al.* Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3787–92 (1999).
 28. Schmidt, J. J. & Stafford, R. G. Fluorogenic Substrates for the Protease Activities of Botulinum. **69**, 297–303 (2003).
 29. Shone, C. C. & Roberts, A. K. Peptide Substrate Specificity and Properties of the zinc-endopeptidase Activity of Botulinum Type B Neurotoxin. *Eur. J. Biochem.* **225**, 263–270 (1994).
 30. Barr, J. R. *et al.* Botulinum Neurotoxin Detection and Differentiation by Mass Spectrometry. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1578–1583 (2005).
 31. Wang, D., Baudys, J., Kalb, S. R. & Barr, J. R. Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **412**, 67–73 (2011).
 32. Wang, D., Baudys, J., Hoyt, K. M., Barr, J. R. & Kalb, S. R. Further optimization of peptide substrate enhanced assay performance for BoNT/A detection by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 4779–4786 (2017).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka